

УДК 577.322.24

Д. О. Дормешкин, магистрант (БГТУ);

В. Н. Леонтьев, кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой (БГТУ);

И. Г. Ивашкевич, кандидат химических наук (ИБОХ НАН Беларуси);

А. А. Гилеп, кандидат химических наук, заведующий лабораторией (ИБОХ НАН Беларуси)

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ FAB-ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К КОРТИЗОЛУ

В данной работе проведено молекулярное клонирование генов, кодирующих структуру иммуноглобулинов мыши, специфично связывающих стероидный гормон кортизол. Для этого сконструированы праймеры, охватывающие все семейство генов, кодирующих структуру иммуноглобулинов класса G. Созданы молекулярно-генетические конструкции для эффективной экспрессии рекомбинантных антител в клетках *Escherichiacoli*. Проведена гетерологическая экспрессия Fab-фрагментов антител. Рекомбинантный белок получен в гомогенном состоянии.

The paper dwells upon the molecular cloning of genes coding the structure of mouse immunoglobulins, which can specifically bind steroid hormone cortisol. For these purposes primers, covering all families of genes, which code the structure of immunoglobulins G and molecular-genetic constructions for effective expression of recombinant antibodies in *Escherichiacoli*, were constructed. Heterologous expression of Fab-fragments was performed. Recombinant protein has been isolated in homogenous state.

Введение. Кортизол (рис. 1) является одним из важнейших стероидных гормонов и необходим для поддержания многих функций организма. Как и другие глюкокортикостероиды, кортизол синтезируется в пучковой зоне коры надпочечников из общего предшественника холестерина [1]. Измерение уровня стероидного гормона кортизола в крови имеет большое значение для мониторинга функции гипофиза и коры надпочечников. В настоящее время существует большое множество диагностических систем для количественного определения кортизола в биологических жидкостях. Большинство из них так или иначе используют принцип аффинного узнавания кортизола соответствующими антителами (иммуноглобулинам). Актуальной задачей является улучшение функциональных свойств узнающего модуля диагностических систем, а также удешевление их себестоимости. Один из возможных путей решения этой задачи – использование рекомбинантных антител, обладающих более широким спектром свойств по сравнению с полноформатными антителами.

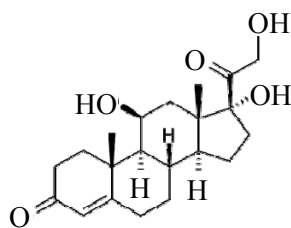


Рис. 1. Структурная формула кортизола

Иммуноглобулины – семейство гликопротеинов, представленных в плазме крови и

тканевых жидкостях позвоночных, способных распознавать и связывать чужеродные для организма вещества (антигены). Участок антигена, с которым взаимодействует антитело, называется эпитопом, а участок антитела, за счет которого оно взаимодействует с антигеном, – паратопом [2].

У высших млекопитающих иммуноглобулины представлены пятью классами IgG, IgM, IgA, IgE и IgD. Наибольший практический интерес представляет самый распространенный класс – IgG, который представлен в организме человека четырьмя подклассами (изотипами): IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Иммуноглобулин представляет собой мультимерный белок, состоящий из двух идентичных тяжелых цепей и двух легких (рис. 2).

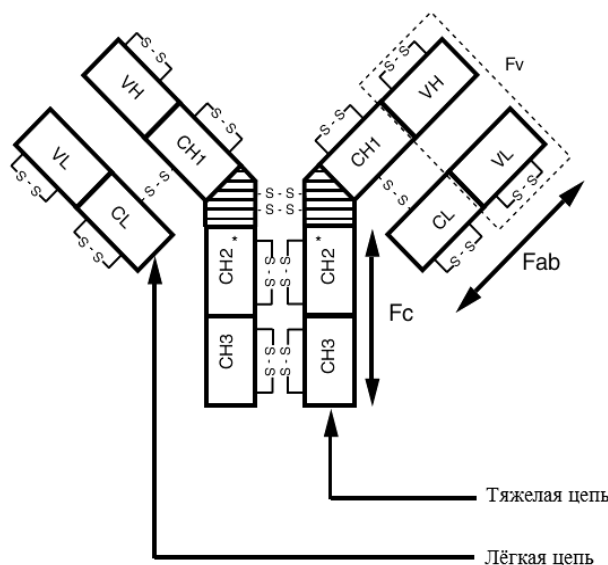


Рис. 2. Строение молекулы иммуноглобулина

Молекула иммуноглобулина условно может быть разделена на две функциональных субъединицы – Fab-фрагмент (fragment-antigenbinding) и Fc-фрагмент (fragment crystallizable). Fc-фрагмент состоит из двух пар константных доменов (CH2 и CH3) и отвечает за взаимодействие с клеточными рецепторами при активации иммунного ответа, а также с белками системы комплимента. Fab-фрагмент участвует в распознавании антигена и состоит из одного вариабельного участка (VL и VH) и одного константного (CL и CH1). Между собой отдельные полипептидные цепи связаны дисульфидными связями и нековалентными взаимодействиями [3]. Кроме того, на уровне CH2 участка молекула гликозилирована.

С развитием молекулярно-генетических технологий широкое распространение получили мини-антитела: Fab- (fragment antigen binding) и scFv- (single chain fragment variable) фрагменты, которые способны специфично связывать антиген, но обладают большей проникающей способностью, чем полноразмерные антитела [4]. Fab-фрагмент представляет собой белок массой 50 кДа, состоящий из участка тяжелой цепи (VH и CH1) и легкой цепи, соединенных вместе дисульфидными связями и нековалентными взаимодействиями. Фрагмент, состоящий только из вариабельных участков (VH и VL), соединенных между собой пептидным линкером, представляет собой scFv-фрагмент и обладает молекулярной массой 15 кДа. Рекомбинантные мини-антитела могут быть получены в бактериальной системе экспрессии, в отличие от полноразмерных иммуноглобулинов, Fc-домен которых гликозилирован и, соответственно, требует систем посттрансляционной модификации [5]. Структурой и, соответственно, физико-химическими свойствами фрагментов антител легко манипулировать на генном уровне, и они могут быть превращены в полноразмерные антитела для приобретения эффекторных функций [5, 6].

Основная часть. Основной задачей являлось получение высокоаффинных Fab-фрагментов антител к стероидному гормону кортизолу.

Моноклональные антитела, продуцируемые гибридами 5Г-Н2 (получены в Лаборатории химии белковых гормонов ИБОХ НАН Беларуси) способны специфично связывать стероидный гормон кортизол. Однако использование гибридных линий, продуцирующих моноклональные антитела, имеет ряд существенных недостатков, к которым относятся нестабильность клеточных линий, высокая цена культивирования, невозможность проведения генно-инженерных манипуляций с генами иммуноглобулинов [5]. Кроме того, полученные

по гибридной технологии антитела могут содержать примеси иммуноглобулинов мыши, которые повышают вероятность ложных результатов при использовании в диагностических системах. Все эти ограничения можно обойти, используя рекомбинантные антитела, полученные с помощью генно-инженерных методов и экспрессируемые в бактериальной системе.

Первым этапом было выделение тотальной РНК из гибридом 5Г-Н2, продуцирующих специфические антитела к стероидному гормону кортизолу. Тотальная РНК выделялась с помощью набора SV Total RNA Isolation (Promega) и использовалась сразу для постановки реакции обратной транскрипции с олиго-(dT)₁₈ праймерами для получения кДНК (использовался набор реагентов «Реверта-Л» ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Полученная кДНК использовалась в качестве матрицы для амплификации генов, кодирующих структуру тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов. На основе анализа литературных данных [7, 8] и нуклеотидных последовательностей иммуноглобулинов из базы данных *IMGT.org* были сконструированы специфические вырожденные праймеры, охватывающие все разнообразие генов кДНК, кодирующих легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов класса G мыши. Амплификация проводилась в амплификаторе BioRad T100 при следующих условиях: денатурация 94°C 4 мин; 30 циклов – денатурация 94°C 1 мин, отжиг 55°C 1 мин, элонгация 72°C 1 мин. Заключительный этап элонгации – 72°C 10 мин.

Амплифицированные фрагменты разделяли методом гель-электрофореза в 2%-ном агарозном геле с использованием TAE-буфера в присутствии бромистого этидия (результаты регистрировали с помощью видеосистемы Gel Imager 2 («Vilber Lourmat»)). В каждом случае проводили положительный и отрицательный контроль амплификации.

После ПЦР продукты амплификации клонировали в вектор pXcmkn12 и секвенировали для подтверждения правильности последовательности клонированной ДНК (определение нуклеотидной последовательности проводили с использованием наборов «ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cyclor Sequencing Kit», «Big Dye X Terminator Purification Kit» и секвенатора Applied Biosystems 3130). Секвенирование показало, что клонированная тяжелая цепь относится к типу G2a, что согласуется с изотипом продуцируемых гибридомой антител, а легкая цепь – к типу κ.

Для экспрессии Fab-фрагментов антител использовался специально сконструированный

плазмидный вектор pCW-Fab, обеспечивающий высокий уровень экспрессии рекомбинантных антител в периплазматическом пространстве *Escherichiacoli* [3, 9].

Для проведения препаративной экспрессии использовались клетки *E. coli* DH5 α , трансформированные бицистронным вектором pCW-Fab, содержащим клонированные гены Fab-домена.

Культивирование клеток *E. coli* DH5 α проводилось на ТВ среде. Индукция клеточной культуры к синтезу белка осуществляли с помощью IPTG (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид), запускающего транскрипцию посредством индукции лактозного оперона.

Клетки разрушали с использованием гомогенизатора Emulsiflex-C5 при добавлении детергента (CHAPS), ингибитора сериновых протеаз (PMSF) и β -меркаптоэтанол. Центрифугированием отделяли разрушенные клетки. Супернатант наносился на хроматографическую колонку с ProteinA сефарозой. ProteinA – белок, экспрессирующийся в клетках золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* и способный аффинно связывать CH1 домен тяжелой цепи иммуноглобулинов. Это позволяет использовать метод аффинной хроматографии для выделения рекомбинантных Fab-фрагментов (использовалась система выделения и очистки белков Bio-Rad «Bio-Logic»).

Гомогенность полученного белка контролировалась с помощью ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях, который показал наличие двух полипептидных цепей с ожидаемой молекулярной массой, что подтверждает эффективность созданных конструкций. Функциональная активность рекомбинантных Fab-фрагментов антител требует дальнейшего изучения.

Заключение. Проведено молекулярное клонирование генов, кодирующих структуру иммуноглобулинов мыши, специфичных к кортизолу. Результаты секвенирования подтвердили принадлежность клонированных фрагментов к классу иммуноглобулинов. Созданные молекулярно-генетические конструкции позволили провести гетерологическую экспрессию рекомбинантных Fab-фрагментов в клетках *E. coli*. Получен рекомбинантный белок в гомогенном состоянии с соответствующей ожидаемая молекулярной массой. Свойства полученных Fab-фрагментов антител требуют дальнейшего изучения.

Коллектив авторов выражает благодарность Лаборатории химии белковых гормонов и лично доктору химических наук Свиридову О. В. и кандидату химических наук Ивашкевич И. Г. за любезно предоставленные клеточные линии гибридом 5Г-Н2.

Литература

1. Spironelli, C. Cortisol and ACTH plasma levels in maternal filicides and violent psychiatric women / C. Spironelli, F. J. Gradante // *Psychiatr Res.* – 2013. – Vol. 47. – P. 622–627.
2. Иванов, В. Т. Белки иммунной системы. учеб. пособие / В. Т. Иванов; Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина. – М.: ИБХРАН, 1997. – 114 с.
3. Buchner, J. Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli* / J. Buchner, R. Rudolph // *Biotechnology (NY).* – 1991. – Vol. 9 (2). – P. 157–162.
4. Ahmad, Z. A. scFv Antibody: Principles and Clinical Application / Z. A. Ahmad, S. K. Yeap, M. Hamid // *Clinical and Developmental Immunology.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 3–17.
5. Dimitrov, D. S. Therapeutic antibodies: current state and future trends – is a paradigm change coming soon? / D. S. Dimitrov, J. D. Marks // *Methods in Molecular Biology.* – 2009. – Vol. 525. – P. 1–27
6. Jez, J. Significant Impact of Single N-Glycan Residues on the Biological Activity of Fc-based Antibody-like Fragments / J. Jez, A. Castilho, H. Steinkellner // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2012. – Vol. 29. – P. 24313–24319.
7. Strebe, N. Cloning of Variable Domains from Mouse Hybridoma by PCR / N. Strebe, D. Moosmayer, S. Dubel // *Antibody Engineering.* – 2010. – Vol. 1. – P. 3–14.
8. Rohatgi, S. Systematic design and testing of nested (RT-)PCR primers for specific amplification of mouse rearranged/expressed immunoglobulin variable region genes from small number of B-cells / S. Rohatgi, P. Ganju, D. Sehgal // *Journal of Immunological Methods.* – 2008. – Vol. 330. – P. 205–219.
9. Rapid two-step purification of a recombinant mouse Fab fragment expressed in *Escherichia coli* / H. Wlad [et al.] // *Prot. Ex. Pur.* – 2001. – No. 22(2). – P. 325–329.

Поступила 27.02.2013